

金银花叶有效成分的抗氧化活性研究

郑必胜^{1,2}, 李会娜¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广州现代产业技术研究院, 广东广州 510640)

摘要: 建立高效液相转换波长法, 测定金银花叶粗提取物中绿原酸、木犀草素和木犀草苷的含量, 绿原酸占水相原液的含量为 2.05%, 木犀草素、木犀草苷在金银花叶粗提取物 EA 相中的含量分别为 1.12%、0.57%。以抗坏血酸(Vc)为阳性对照的, 用 DPPH·法、FRAP 法、ORAC 法三种体外抗氧化方法来测定和评价金银花叶有效成分的抗氧化作用。结果表明: 金银花叶粗提取物、粗分物、绿原酸、木犀草素及木犀草苷均具有良好的抗氧化性, 其中木犀草素的抗氧化能力最强, 其 IC₅₀ 值为 0.01764 mg/mL, 还原能力 1751.8±13.9 mmol/L, ORAC 值 23817.44 μmol Trolox/g。其次为粗分 30% 乙醇洗脱相, 其 IC₅₀ 值为 0.02548 mg/mL, 还原能力 933.8±11.6 mmol/L, ORAC 值 10557.97 μmol Trolox/g, 且各物质随着抗氧化剂浓度及纯度的增加, 抗氧化性逐渐增强。因此对金银花叶有效成分在抗氧化方面的应用具有广阔的开发利用前景, 可作为新型的高效无毒的抗氧化剂。

关键词: 金银花叶; 抗氧化性; DPPH·法; FRAP 法; ORAC 法

文章编号: 1673-9078(2013)12-2870-2876

Antioxidant Activity Constituents of *Lonicera japonica* Leaves

ZHENG Bi-sheng^{1,2}, LI Hui-na¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Modern Industrial Technology Research Institute, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A wavelength conversion method was established to determine chlorogenic acid, luteolin and luteoloside in *Lonicera japonica* leaves. The content of chlorogenic acid in aqueous phase was 2.05%, while the content of luteolin and luteoloside in EA phase were 1.12% and 0.57%, respectively. The antioxidative activity of effective components in *Lonicera japonica* leaves was evaluated by DPPH·, FRAP and ORAC with Vc as reference substance. The results showed that crude extraction, crude fraction, chlorogenic acid, luteolin and luteoloside in *Lonicera japonica* leaves all had great antioxidative activity. The strongest antioxidant capacity substance was luteolin, its IC₅₀ value, reducing capacity and ORAC value were 0.01764 mg/mL, 1751.8±13.9 mmol/L and 23817.44 μmol Trolox/g, respectively. The crude fraction eluted by 30% ethanol also showed high antioxidative activity, its IC₅₀ value, reduction capability and ORAC value were 0.02548 mg/mL, 933.8±11.6 mmol/L, and 10557.97 μmol Trolox/g, respectively. The antioxidative activity of each constituent increased with the increase of concentration and purity of the antioxidant. Therefore, there is broad development and utilization prospect of the antioxidant activity constituents of *Lonicera Japonica* leaves as a new type efficient non-toxic antioxidant.

Key words: *Lonicera japonica* leaves; antioxidative activity; DPPH·; ferric reducing antioxidant potential assay; oxygen radical absorbance capacity

天然产物特指从动物、植物、海洋生物及微生物体内分离成分复杂且具有多种多样生物活性的二次代谢产物和内源性化合物^[1], 在医药、食品、化妆品、保健品等领域应用广泛。目前, 抗氧化活性的研究是天然产物领域研究的热点。研究发现, 自由基可引发食品的链式氧化, 加速食品的腐败变质, 影响人体健康^[2]。丁基羟基茴香醚 (BHA)、叔丁基对苯二酚

收稿日期: 2013-07-29

基金项目: 广州市科技计划项目资助 (2012J5100024)

作者简介: 郑必胜 (1966-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农副产品深加工

通讯作者: 李会娜

(TBHQ)、2,6-二叔丁基对甲苯酚 (BHT) 等化学合成抗氧化剂的广泛应用有效地预防和控制自由基氧化损伤给人体带来的危害^[3]。但由于其负面效应及安全性的缺陷, 这些抗氧化剂逐渐被限制或禁止, 从天然产物中提取得到的高效无毒的抗氧化剂越来越受人们的青睐。

目前也关于金银花叶的抗氧化的研究, 张宁^[4]用分光光度计法测定金银花叶乙醇提取物抗羟自由基氧化活性, 研究表明其乙酸乙酯萃取物在 1mg/mL 的低浓度下就显示出了较好的抗氧化效果。吴雪芬^[5]等用胡萝卜素漂白法、测定法和过氧化氮氧化法测定金银花叶多酚粗提物、绿原酸粗提物和黄酮粗提物的抗氧

化活性, 研究表明三种粗提物均具有良好的抗氧化作用, 黄酮和绿原酸粗提物的氧化还原容量分别是 BHA 的 2.8 和 2.0 倍, 但这些研究大部分都是对其粗提物且采用单一的方法对金银花叶进行抗氧化活性研究, 而对其粗分物及分离纯化所得的单体绿原酸、木犀草素、木犀草苷的报道缺少为见到, 特别是对木犀草苷的研究, 目前大部分停留在其提取及检测方面。另外, 因不同评价方法的实验原理及适用范围的差异使结果也有差异。为了准确全面地考察金银花叶的抗氧化活性, 本章通过以抗坏血酸(Vc)为阳性对照的 DPPH·法、FRAP 法、ORAC 法三种体外抗氧化方法来测定和评价金银花叶粗提物及分离单体的抗氧化作用, 比较不同部分之间的抗氧化活性差异。

1 试剂和设备

1.1 材料和试剂

金银花叶, 由河南商丘金银花种植基地提供; DPPH·(C₁₈H₁₂N₅O₆)、抗坏血酸(Vc)、TPTZ、AAPH、荧光素钠均由美国 Sigma-Aldrich 公司提供; 乙醇(CH₃CH₂OH)、醋酸钠购买于南京化学试剂有限公司; 三氯化铁、硫酸亚铁(FeSO₄·7H₂O)、K₂HPO₄·3H₂O、KH₂PO₄均购买于天津市福晨化学试剂厂; 盐酸、冰乙酸均购买于天津市富宇精细化工有限公司。

1.2 仪器设备

721G 可见分光光度计、XW-80A 漩涡混合器、ZF-2 三用紫外分析仪, 上海精科实业有限公司; HWS24 电热恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; BS-200-S(精度: 0.001 g)分析天平, Sartorius 仪器有限公司; 荧光化学分析仪, Thermo Fisher Scientific USA; KQ-100DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Ultimate 3000 戴安高效液相色谱仪, 杭州纽蓝科技有限公司; SHZ-D(III) 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 样品的处理与粗分离^[6]

金银花叶在 40 °C 温度下烘干粉碎, 称重为 3.45 kg, 用索氏动态提取浓缩机组在 65% 乙醇、料液比 1:10、提取温度 60 °C、提取时间 2 h 的条件下提取 2 次, 回收乙醇。浓缩液 6300 mL 于 45 °C 下真空浓缩到 3080 mL。取其中的 1540 mL 按 1:1 比例用石油醚

脱脂 6 次, 回收石油醚, 按 1:1 比例用乙酸乙酯萃取 8 次, 确保乙酸乙酯相和水相基本分开, 收集乙酸乙酯层(以下简称 EA)(42.558 g)和水层 1450 mL。将乙酸乙酯相室温下烘干备用。

1.3.2 分离纯化^[6-8]

据文献报道: 绿原酸集中在水和 10%、20% 醇溶液洗脱部分, 解吸率达 93.3%; 木犀草苷集中在 30% 和 40% 醇溶液洗脱部分, 解吸率达 93.1%。木犀草素多集中在 70% 醇洗脱部分。

取 200 mL 水相上预先处理好的 D101 大孔树脂, 吸附 2 h 后, 先用 2 BV 的水洗去糖、蛋白分子及其它水溶性杂质, 再依次用 6 BV 的水、8 BV 10% 的乙醇、8 BV 30% 的乙醇洗脱, 每 200 mL 收集一瓶, 用乙酸乙酯:丙酮:甲酸:水=7:3:1:1.2 检测合并, 收集水相洗脱液、10%、30% 乙醇洗脱液, 真空浓缩。精确称取 20 mg EA 相上预先处理好的 100~200 目的聚酰胺用 15% 的乙醇超声溶解, 样品上柱后吸附 2 h, 先用 6 BV 水洗去糖、蛋白分子及其它水溶性杂质, 然后采用 50%、70% 的乙醇溶液梯度洗脱, 采用 50% 的乙醇梯度洗脱时, 柱中开始有淡黄色和黄色色带出现, 收集淡黄色色带, 当淡黄色色带消失时, 改用 70% 的醇洗脱, 黄色色带下移的速度加快, 收集此色带从开始到流完的洗脱液, 每 100 mL 接一瓶, 用乙酸乙酯:丙酮:甲酸:水=7:3:1:1.2 作为展开剂初步检测合并, R_f 值相同的合并到一起, 真空浓缩。水相的 30% 乙醇洗脱相与 EA 相 50% 相 R_f 值相同, 初步断定为同一种物质, 然后分别将收集得到的水相、30% 乙醇洗脱液再次过 100~200 目聚酰胺, 用 2 BV 洗去杂质, 后分别用 8 BV 10% 乙醇洗脱水相。8 BV 30% 乙醇洗脱 EA 50% 洗脱相, 同上薄层色谱初步检测, 合并 R_f 值相同部位。分别用甲醇反复重结晶得三种物质白色、黄绿色和浅黄色晶体。

1.4 分离纯化物质的检测

1.4.1 供试品溶液的配制

精确称取乙酸乙酯相 11.5 mg 及 5 μL 水相原液置于 10 mL 烧杯中超声使其充分溶解, 转移到 10 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇稀释到刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 的滤膜, 待用。分离纯化所得绿原酸、木犀草素、木犀草苷各 5 mg 置 10 mL 烧杯中超声使其充分溶解, 转移到 10 mL 容量瓶中, 用 70% 乙醇稀释到刻度, 制成混合样品, 摇匀, 过 0.45 μm 的滤膜, 待用。

1.4.2 检测波长

用 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计在 200~500 nm 波长下扫描, 确定检测波长。

1.4.3 检测条件

参照辛华^[9]等方法的基础上,用高效液相转换波长法同时测定绿原酸、木犀草素、木犀草苷,之前并未有关于同时测定三种物质的报道。采用 Waters C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈(A)-0.4% 磷酸(B)为流动相,流动相梯度: 0 min (10% A) → 10 min (15% A) → 20 min (25% A) → 25 min (30% A) → 40 min (10% A),流速为 0.8 mL/min,柱温为室温,检测波长 330 nm, 355 nm。理论塔板数不低于 3000。

1.4.4 标准曲线的建立

分别精确称取绿原酸、木犀草素、木犀草苷对照品 5.0、6.0、6.0 mg 于三个 10 mL 的烧杯中充分溶解,用 70%乙醇制成分别含绿原酸、木犀草素、木犀草苷分别为 50、30、30 μg/mL 的对照品储备溶液,分别精密吸取上述对照品储备溶液 2、4、6、8 和 10 mL 置于 10 mL 容量瓶中,加 70%乙醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 的滤膜过滤,待用。

1.5 DPPH 法测定金银花叶提取物粗及单体的抗氧化活性

1.5.1 抗氧化活性测定样品的制备

分别吸取已经配置好的 1 mg/mL 的 EA 相,EA 粗分 50%乙醇相,EA 粗分 70%乙醇相,结晶 50%相木犀草苷,结晶 70%相木犀草素样液各 0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0、1.4、1.8、2.0 mL 至 10 mL 的容量瓶中,用 70%乙醇稀释至刻度,配制成浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.04、0.06、0.08、0.10、0.14、0.18、0.20 mg/mL 待测样液,备用。

1.5.2 抗氧化活性测定

参照 Sanchez-Moreno C 的方法^[10],按公式 1 计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率 } S\% = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

注: A_i 为 70%乙醇在 517 nm 处的吸光度值; A_0 为 DPPH 标准溶液和 70%乙醇混合液在 517 nm 处的吸光度值; A_j 为待测样品和 70%乙醇在 517 nm 波长时的吸光值。

1.6 FRAP^[11-12]法测定金银花叶提取物粗及单体的抗氧化活性

参照 Benzie I F, Strain 的方法,求得线性回归方程 $y = 1.114x - 0.027$ 和相关系数 $R^2 = 0.9995$ 。

1.7 ORAC 法测定金银花叶提取物粗及单体

的抗氧化活性

1.7.1 测定方法

参考 Ou 等^[13]的方法。略有改动,首先将 AAPH 溶解在 75 mmol/L 磷酸缓冲溶液 (pH=7.4) 中,浓度为 160 mmol/L。荧光素钠溶解在 75 mmol/L 磷酸缓冲溶液中,浓度为 4×10^{-3} mmol/L,用锡纸包裹放入低温冰箱保存,使用前稀释 1000 倍。所有样品均由 75 mmol/L 磷酸缓冲溶液稀释。96 孔黑色微孔板被使用作为反应槽。96 微孔板体系包括: 20 μL 稀释样品提取液和 200 μL 的荧光素钠液,最后由自动进样器加入 20 μL AAPH 诱发荧光淬灭。使用 TECAN 荧光酶标仪的实验设置参数为: 激发波长 485 nm,发射波长 528 nm, 37 °C; 循环数: 35; 循环周期: 270 s; 振荡: 8 s; 振荡幅度: 4 mm。最终结果以 ORAC 值 μmol Trolox/g 表示。

1.7.2 Trolox 标准曲线

分别取 6.25、12.5、25、50、100 μmol/L 的 Trolox 溶液绘制标准曲线,ORAC 方法中 Trolox 标准曲线方程为: $y = 4.53x - 22.13$,标准曲线的决定系数 $R^2 = 0.9999$ 。

2 结果与讨论

用 HPLC 法测定分离纯化所得物质,以抗坏血酸 (Vc) 为阳性对照,运用 DPPH 法、FRAP 法、ORAC 法三种体外抗氧化方法来测定和评价金银花叶粗提物及分离单体的抗氧化作用。比较得到的不同粗分相及单体之间的抗氧化活性差异,寻找出抗氧化活性相对较好的部分,抗氧化活性的测定实验中,每次试验均设置三个平行,取平均值。所得到的实验数据通过 Excel 软件求的标准差值,并用 Origin 7.5 作出各个方法所测得的自由基清除趋势图;不同浓度的粗提物及单体抗氧化活性由半数清除浓度 (IC₅₀) 值来表示,每个测试样品的 IC₅₀ 值是通过数据处理软件 Origin 7.5 做出线性模拟之后求得。

2.1 金银花叶有效成分的检测

2.1.1 检测波长的确定

用 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计在 200~500 nm 波长下扫描结果表明: 绿原酸的最佳检测波长为 330 nm,木犀草素、木犀草苷的最佳检测波长为 355 nm、354 nm,如图 1。

2.1.2 标准曲线的绘制

分别取上述混合对照品储备溶液 10 μL 注入液相

色谱仪,测定结果表明绿原酸回归方程: $Y=6610.8X+657.4$, $r^2=0.9997$, 在 $10 \mu\text{g/mL} \sim 50 \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积有良好的线性关系;木犀草素回归方程: $Y=12528X-4006.9$, $r^2=0.9993$, 在 $6 \mu\text{g/mL} \sim 30 \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积有良好的线性关系。木犀草苷回归方程: $Y=8533.5X-7439.1$, $r^2=0.9991$, 在 $6 \mu\text{g/mL} \sim 30 \mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积有良好的线性关系。

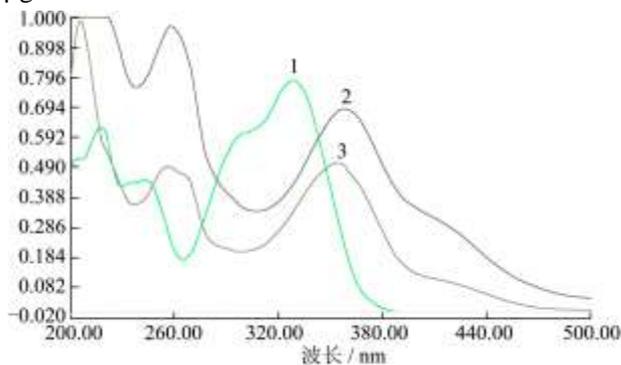


图1 波长扫描图

Fig.1 Wavelength scan

注: 1-绿原酸; 2-木犀草素; 3-木犀草苷。

2.1.3 检测结果

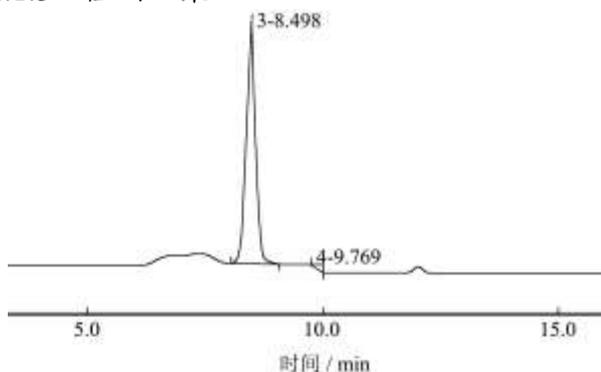


图2 对照品绿原酸HPLC图

Fig.2 HPLC chromatogram of chlorogenic acid

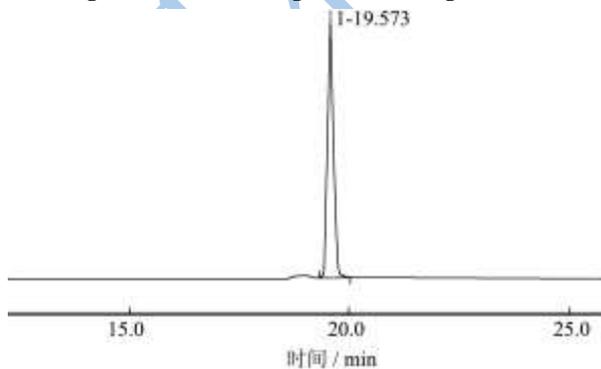


图3 对照品木犀草苷HPLC图

Fig.3 HPLC chromatogram of luteoloside

如图2~5及表1所示,分离纯化得到的绿原酸、木犀草素、木犀草苷三种物质的外观颜色分别为白色粉末、黄绿色粉末和浅黄色粉末,经HPLC鉴定,分离纯

化所得的绿原酸、木犀草素、木犀草苷与标准品的出峰时间一致,且纯度均达到90%以上。绿原酸占水相原液的含量为2.05%,木犀草素、木犀草素在金银花叶粗提物EA相中的含量分别为1.12%、0.57%。

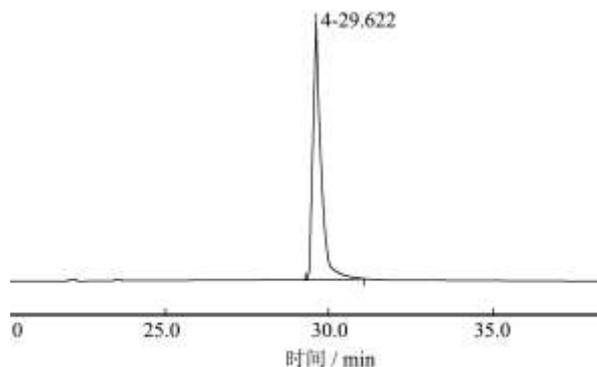


图4 对照品木犀草素HPLC

Fig.4 HPLC chromatogram of luteolin

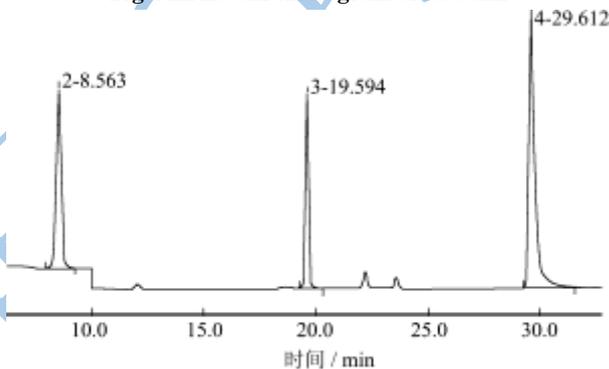


图5 混合样品的HPLC图

Fig.5 HPLC chromatogram of the mixed solution

表1 金银花叶中绿原酸、木犀草素和木犀草苷的含量测定结果

Table 1 Contents of chlorogenic acid, luteolin and luteoloside in

Lonicera Japonica Leaves	
样品	含量/%
绿原酸	2.05±0.12
木犀草苷	1.12±0.06
木犀草素	0.57±0.15

2.2 DPPH 法测定结果

从表2~4可以看出,金银花叶粗提物、粗分物及单体均表现出具有 DPPH· 自由基的清除活性。DPPH· 自由基清除活性研究结果表明:清除活性呈现出随着各不同物质的质量浓度增加而增大的规律,当其浓度达到 0.08 mg/mL 时,粗分水洗脱、水相粗分、30%乙醇洗脱相、绿原酸、EA 相、EA 50%乙醇相、EA 70%乙醇相、木犀草素及木犀草苷的 DPPH· 自由基清除率均达到 50% 以上。其中木犀草素清除力最强,与 Vc 的抗氧化能力相当,其 IC₅₀ 值为 0.018 mg/mL,其次为水相 30%乙醇洗脱相,其 IC₅₀

值为 0.025 mg/mL。水相原液较弱,当浓度达到 0.1 mg/mL 时,水相原液的 DPPH· 自由基清除率达到 50%以上,其 IC₅₀ 值为 0.083 mg/mL。水相 10% 乙醇洗脱相清除活性最弱,当浓度达到 0.18 mg/mL 时,水相 10% 乙醇洗脱相的 DPPH· 自由基清除率达到 50%

以上,其 IC₅₀ 值为 0.15 mg/mL。得到的绿原酸的清除能力是水相原液的 2.42 倍;木犀草素的清除能力是 EA 70% 洗脱相的 3.88 倍;木犀草苷的清除能力是 EA 50% 的 1.28 倍。

表 2 金银花叶水相的 DPPH· 的清除率及 IC₅₀ 值

Table 2 The scavenging rate on DPPH· and IC₅₀ value of the aqueous phase in *Lonicera japonica* leaves

样品浓度/(mg/mL)	水相原液/%	粗分水洗脱/%	水相 10% 醇洗脱/%	水相 30% 醇洗脱/%
0.01	12.06±4.70	11.17±7.84	10.48±2.74	26.07±3.30
0.02	18.31±2.61	18.21±2.73	12.55±3.36	41.10±3.56
0.03	23.40±4.32	27.59±1.04	15.86±3.51	59.72±0.35
0.04	27.33±1.30	35.03±2.40	19.17±3.69	70.21±1.31
0.06	37.94±1.78	44.14±1.13	23.59±1.55	72.14±1.72
0.08	48.11±0.46	53.93±0.59	31.17±1.93	72.90±2.30
0.1	59.30±0.49	61.38±0.23	38.07±1.27	77.24±0.78
0.14	69.19±0.20	75.86±0.48	47.59±1.43	79.03±0.63
0.18	70.64±1.05	77.52±0.18	58.20±0.63	80.97±0.64
0.2	72.67±0.11	80.26±0.53	59.03±0.82	82.90±0.27
拟合曲线	Y=7.35+541.70X	Y=10.96+496.42X	Y=7.48+286.87 X	Y=11.52+1510.4X
R 值	0.9995	0.9779	0.9985	0.9948
N	7	8	9	4
IC ₅₀ 值	0.083	0.079	0.15	0.025

表 3 金银花叶 EA 相各部分的 DPPH· 的清除率及 IC₅₀ 值

Table 3 The scavenging rate on DPPH· and IC₅₀ value of each part of EA in *Lonicera Japonica* leaves

样品浓度/(mg/mL)	EA 相/%	EA50% 醇洗脱/%	EA70% 醇洗脱/%
0.01	20.00±1.44	18.76±2.65	18.62±2.42
0.02	32.14±0.99	27.31±1.77	22.76±1.63
0.03	40.83±1.67	34.62±1.51	28.69±1.95
0.04	53.10±1.97	41.39±1.07	32.83±1.45
0.06	71.45±0.22	55.31±1.01	46.62±1.02
0.08	72.83±1.16	65.66±0.64	58.76±0.38
0.1	75.45±0.42	72.28±1.06	65.52±0.52
0.14	77.52±0.18	74.07±0.47	67.59±0.99
0.18	80.55±0.26	75.86±0.46	70.21±0.56
0.2	82.07±0.45	78.62±0.35	72.55±0.85
拟合曲线	Y=10.68+1025.72X	Y=15.75+603.09X	Y=12.41+549.89X
R 值	0.9985	0.9915	0.9929
N	5	7	7
IC ₅₀ 值	0.038	0.057	0.068

表 4 金银花叶分离纯化单体及 Vc 的 DPPH· 的清除率及 IC₅₀ 值

Table 4 The scavenging rate on DPPH· and IC₅₀ value of purified monomer of *Lonicera Japonica* leaves and Vc

样品浓度/(mg/mL)	绿原酸/%	木犀草苷/%	木犀草素/%	Vc/%
0.01	21.93±3.46	19.76±3.18	38.34±0.92	22.34±3.62
0.02	35.03±1.04	29.45±1.60	54.34±0.68	67.17±0.59
0.03	44.69±0.62	38.86±2.55	67.72±0.72	74.34±0.95
0.04	60.69±0.26	48.31±2.24	70.76±0.71	80.69±0.36

转下页

接上页

0.06	68.14±0.65	61.90±1.52	73.10±0.38	96.14±0.36
0.08	70.34±0.82	69.86±0.67	74.76±0.39	96.28±0.22
0.1	72.55±0.55	72.14±3.22	76.69±0.11	96.55±0.29
0.14	73.93±0.54	74.90±1.84	78.48±0.36	
0.18	77.10±0.45	77.55±1.39	80.55±0.44	
0.2	78.90±0.79	79.93±0.89	82.76±0.43	
拟合曲线	Y=9.1+1259.4X	Y=12.55+847.19X	Y=24.09+1469X	Y=22.48+4482.76X
R 值	0.9957	0.9924	0.9987	
N	4	7	7	
IC ₅₀ 值	0.033	0.044	0.018	0.016

金银花叶粗提物及单体清除 DPPH· 自由基的由大到小的顺序为: Vc>木犀草素>粗分 30%乙醇洗脱相>绿原酸>EA 相>木犀草苷>EA 50%乙醇洗脱相>EA 70%乙醇洗脱相>粗分水洗脱相>水相原液>粗分 10%乙醇洗脱相。

乙醇洗脱相>木犀草苷>EA 50%乙醇洗脱相>绿原酸>EA 相>EA 70%乙醇洗脱相>水相原液>粗分 10%乙醇洗脱相>粗分水洗脱相。

2.3 FRAP 法测定结果

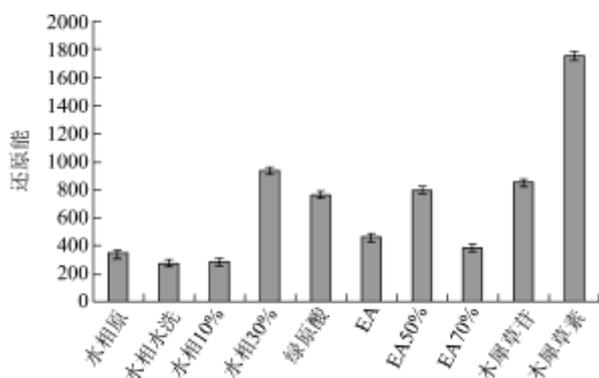


图 6 FRAP 测定结果图

Fig.6 FRAP Measurement results

测定结果表明金银花叶的粗提物、粗分物及分离纯化所得的绿原酸、木犀草素、木犀草苷均具有一定的还原能力。其中木犀草素的还原能力最强，还原能力高达 1751.8 mmol/L；其次是水相 30%乙醇洗脱相，还原能力达 933.8 mmol/L，这与用 DPPH 法测定的结果一致，木犀草素的还原能力是水相 30%乙醇洗脱相的约 1.88 倍。还原能力最弱的是粗分水洗脱相，其还原能力是 276.6 mmol/L，约为木犀草素还原能力的 15.79%。其次是水相原液，其还原能力是 341.3 mmol/L，约为木犀草素还原能力的 19.48%。就水相而言，绿原酸的还原能力是水相原液、粗分水洗脱相的 2.24 倍、2.76 倍。木犀草素、木犀草苷的还原能力是 EA 相的 3.83 倍和 1.86 倍。由此可知，对金银花叶进行分离纯化很有必要，单体的还原能力要比粗提物的还原能力高。

如图 6 所示，金银花叶的粗提物、粗分物及单体的还原能力由大到小的顺序为：木犀草素>粗分 30%

2.4 ORAC 测定结果

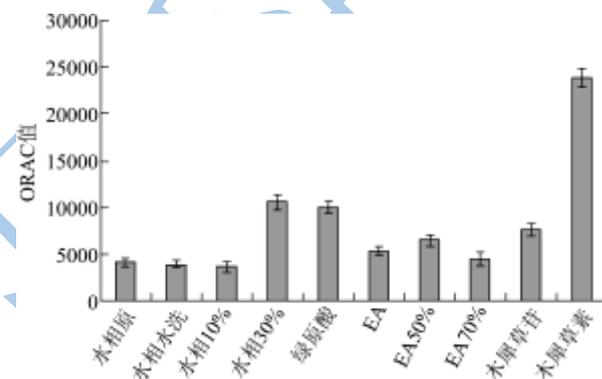


图 7 ORAC 测定结果

Fig.7 ORAC Measurement result

本文初次运用 ORAC 法测定金银花叶中有效成分的抗氧化性，结果表明：木犀草素的 ORAC 值高达 23817.44 μmol Trolox/g，大约是 EA 70%乙醇洗脱相的 5.26 倍，木犀草苷的 ORAC 值约为 EA 50%乙醇洗脱相的 1.18 倍，绿原酸的 ORAC 值约为水相原液的 2.41 倍。

如图 7 所示，金银花叶的粗提物、粗分物及绿原酸、木犀草素、木犀草苷的抗氧化性顺序由大到小为：木犀草素>粗分 30%乙醇洗脱相>绿原酸>木犀草苷>EA 50%乙醇洗脱相>EA 相>EA 70%乙醇洗脱相>水相原液>粗分水洗脱相>粗分 10%乙醇洗脱相。

3 结论

从金银花叶粗提物及绿原酸、木犀草素、木犀草苷的清除 DPPH· 自由基、FRAP 法还原能力、ORAC 抗氧化能力的大小顺序中可以看出，黄酮类物质的抗氧化能力明显高于多酚类物质，且分离纯化所得单体的抗氧化能力普遍高于粗提物及粗分物。且三种方法在结果顺序上存在差异，其中一个原因是因为不同

的方法清除的自由基种类及原理不同,其中一种方法表现出的清除自由基能力并不能反映总体抗氧化能力或对其他自由基的清除能力。另一方面是因为DPPH·的颜色因单电子转移反应和氢转移反应而被消除,由于空间位阻的存在,在某些条件下,DPPH·自由基会与其他自由基(如烷氧自由基)发生化学反应。另外,ORAC法对温度非常敏感且其中的荧光素钠的荧光强度对pH相对敏感,当pH低于7时,其荧光强度显著降低。FRAP法测定的是样品对高价态离子的还原能力,测定过程中不包含活性氧,因此,并不能完全反映打破自由基链式反应或抗氧化剂阻断的抗氧化能力。

参考文献

- [1] Harvey A L. Natural products as a screening resource [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, 11(5): 480-484
- [2] Choe E, Min D B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2006, 5(4): 169-186
- [3] Choe E, Min D B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, 8(4): 345-358
- [4] 张宁,曹光群.金银花叶的抑菌活性和抗氧化性研究[J].*牙膏工业*,2008,3:29
ZHANG Ning, CAO Guang-qun. Study on activity of effect of restraining bacterium and antioxidation of extract components in *Lonicera japonica* Thunb's leaf [J]. *Toothpaste Industry*, 2008, 3: 29
- [5] 武雪芬,郑超萍,李桂兰.金银花叶提取物的抗氧化作用研究[J].*河南化工*,1999,10:10
WU Xue-fen, ZHENG Chao-ping, LI Gui-lan. Study on activity of antioxidation of extract components in *Lonicera japonica* Thunb's leaf [J]. *Henan Chemicals*, 1999, 10: 10
- [6] 罗悠,陈莉华,梁玄,等.金银花叶茎藤中黄酮与绿原酸同时提取分离工艺[J].*吉首大学学报(自然科学版)*,2011,32(5): 92-94
LUO You, CHENG Li-hua, LIANG Xuan, et al. Simultaneous extraction and isolation of Chlorogenic Acid and Flavonoids from Leaves and Rattan of *Lonicera Japonica* [J]. *Journal of Jishou University (Natural Science Edition)*, 2011, 32(5): 92-94
- [7] 王丽婷,王丽娟.金银花叶中木犀草素的分离与鉴定[J].*时珍国医国药*,2010,21(11):2947-2949
WANG Li-ting, WANG Li-juan. Isolation and Identification of luteolin in *Lonicera japonica* Thunb's leaf [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2010, 21(11): 2947-2949
- [8] 王永慧,孙荣进,叶方.金银花中绿原酸和木犀草苷的薄层色谱鉴别方法研究[J].*中国医药导报*,2012,11(9):136-137
WANG Yong-hui, SUN Rong-jin, YE fang. The study of the TLC identification method of Luteoloside and Chlorogenic Acid in *Lonicera japonica* Thunb [J]. *China Medical Herald*, 2012, 11(9): 136-137
- [9] 辛华,丰杰,程若敏,等.HPLC测定不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷[J].*中国实验方剂学杂志*,2011,17(2):60-63
XIN Hua, FENG Jie, CHENG Ruo-min, et al. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Galuteolin in Honeysuckle [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2011, 17(2): 60-63
- [10] Sanchez-Moreno C, Larrauri J A, Saura-Ca ixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols [J].*J. Sci. Food Agric.*, 1998, 76: 270-276
- [11] Benzie I F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of oxidant power: the FRAP assay [J]. *Anal. Biochem.*, 1996, 239: 70-76
- [12] 吴兰芳,蒋爱民,曲直,等.霉菌型黑豆豆鼓的主要成分及其抗氧化活性研究[J].*现代食品科技*,2013,29(1):51-54
WU Lan-fang, JIANG Ai-min, QU Zhi, et al. Study on the main components and Antioxidant Activity of Aspergillus-type Fermented Soybean [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(1): 51-54
- [13] Ou B X, Hampsch W M, Prior R L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using glu2 orescein as the fluorescent probe [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49(10): 19-26